

*А.Р. САНСЫЗБАЙ, Н.Б.СӘРСЕМБАЕВА, Қ.М. РОМАШОВ,
К.Т.СҰЛТАНҚҰЛОВА, Д.А.САРЫБАЕВА*

ЕТ ШИКІЗАТЫН ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУДА ПОЛИМЕРАЗДЫ ТІЗБЕКТІ РЕАКЦИЯНЫҢ МӘНІ

(«Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын ғылыми зерттеу» институты,
Гвардейский қалашығы, ҚазҰАУ, Алматы қаласы;)

Полимеразды тізбекті реакция (ПТР) дегеніміз – ДНҚ in Vitro белгілі бір максаттағы фрагментінің селективтік амплификациясы. ПТР жайында ең алғаш 1971 жылы Клерре жазып кеткен. Бірақ ол кезде ПТР қолданысқа енбеді. 1983 жылы «Cetus» фирмасының қызметкері Кэрри Мюллис бұрында белгілі ПТР-ді ұсынды.

Бұл әдістің мәні- ДНҚ in Vitro өзі атқаратын бірегей қабілеттілігіне, ДНҚ қосақталған спиральді репликация, оның жіптерінің таралуы, комплементарлық принципте ДНҚ тізбектерінің бітуіне негізделген. Ветеринария мамандарының ДНҚ – диагностика әдісін меңгеруі, полимеразды реакция тізбегіне (ПТР) негізделген өте сезімтал тест-жүйені практикаға енгізуге мүмкіншілік берді.

Соңғы жылдары ДНҚ-амплификациялау әдісі ет шикізаты және көп компонентті ет өнімдері түрлерін анықтауда кеңінен қолданыла бастады [1].

Бұл бұрынғы ет түрін анықтау әдістерімен салыстырғанда әлдеқайда тиімді [2].

Қазіргі кезде полимеразды тізбекті реакцияның (ПТР) бірнеше модификациясы ұсынылады. ДНҚ және РНҚ-фрагменттерін репликациялауға негізделген ПТР, жаңа модификациялары және амплификациялық жаңа технология дайындалуда.

Еттің түрін анықтауда нуклеотидті жүйелікті қолдану ПТР жасаудың маңызды кезеңі болып табылады [3].

Шетел ғалымдары дайындаған ПТР тест жүйесімен еттің түрін анықтауға (ұсақталған немесе кішкене кесек жартылай өнім, консерві және шұжықтар, тұздалған ет, піскен ет және мал азықтары) болады [4].

Мал ұлпасын идентификациялауда жаңа тест-жүйе сынақтан өтті, ол – real-time PCR.

Бірақ та мал өнімдерін анықтауға арналған отандық диагностикалық жүйе жоқ. Қолданыстағы диагностикалық қоспаның түрін анықтағанымен, өнімдегі және дайын тамақтағы мөлшерін анықтай алмайды. Жұмысты осы кемшілікті жоюға бағыттаған жөн, демек ветсансараптауға сапасы мен саны да керек [5].

Материалдар және әдістер

Зерттеу нысанын идентификациялау үшін мынандай ет түрлері алынды: сиыр еті, шошқа еті, тауық еті.

Ет шикізатының ДНҚ бөлуде фенолды экстракция әдісін қолдандық.

Праймерді синтездеу сиыр, тауық, шошқа ет шикізат гендерін талдау «GeneBank» халықаралық банкінің мәліметтері бойынша жүргізілді.

Праймерлерді Expedite 8909, Applied Biosystems (АҚШ) олигонуклеотидтер синтезаторында синтездедік.

ПТР жүргізу

ПТР жүргізу үшін келесі қатардағыдай реакциялық қоспа дайындалды.

x10 ПЦР буфер (100 мМ Трис-НСІ, рН 8,3; 500 мМ КСІ)	- 5 мкл
MgCl ₂ (25 мМ)	- 10 мкл
10 мМ dNTP mix	- 1 мкл
Тура праймер (20 рМоль)	- 1 мкл
Кері праймер (20 рМоль)	- 1 мкл
ДНҚ	- 1 мкл

Тақ ДНК полимераза (1 ед/мкл) - 3 мкл
 ПТР су - 50 мкл дейін

Зерттеу нәтижелері

Ет шикізаттарына түрлік ерекшелік бойынша праймер дайындау

Сиыр, тауық, шошқа ет шикізаттарының гендерін талдау «GeneBank» халықаралық банкінің мәліметтері бойынша жүргізілді. «GeneBank» халықаралық банкінің мәліметтері негізінде праймерлер таңдап алынды.

1- кесте. Сиыр, тауық, шошқа ет шикізаттарының гендерін айқындайтын праймерлер

Тура SIM-праймері 5' - TGAGGACAAATATCATTCTGACC -3'
Кері BOS праймері : 5' - TAGAGCAAGAATTAGGATAGAGAACG -3'
Кері SUS праймері : 5' - AATAGGAGATGTACGGCTGCGACG-3'
Кері GUL праймері : 5' - AATGGGGTGAGTATGAGGAGTTAA-3'

Элонгация кезеңінің уақыттық және температуралық профильдері ДНК-ның Тақ-полимеразалары 72⁰С кезінде тиімді белсенділікке, ал «жұмыс» жылдамдығы 1000 нуклеотид/мин құрай алатынына байланысты эмпирикалық түрде таңдап алынды. Бұны ескере элонгация кезеңі 72⁰С температурада, 30 сек бойы өткізу шешілді. Бұдан басқа амплификацияның циклдық бағдарламасын аяқтауынан кейін, ПТР-дің соңғы циклында пайда болатын амплификондардың неғұрлым толық синтезі үшін элонгацияның пролонгирленген қорытынды кезеңі 3 мин бойы жүзеге асырылды.

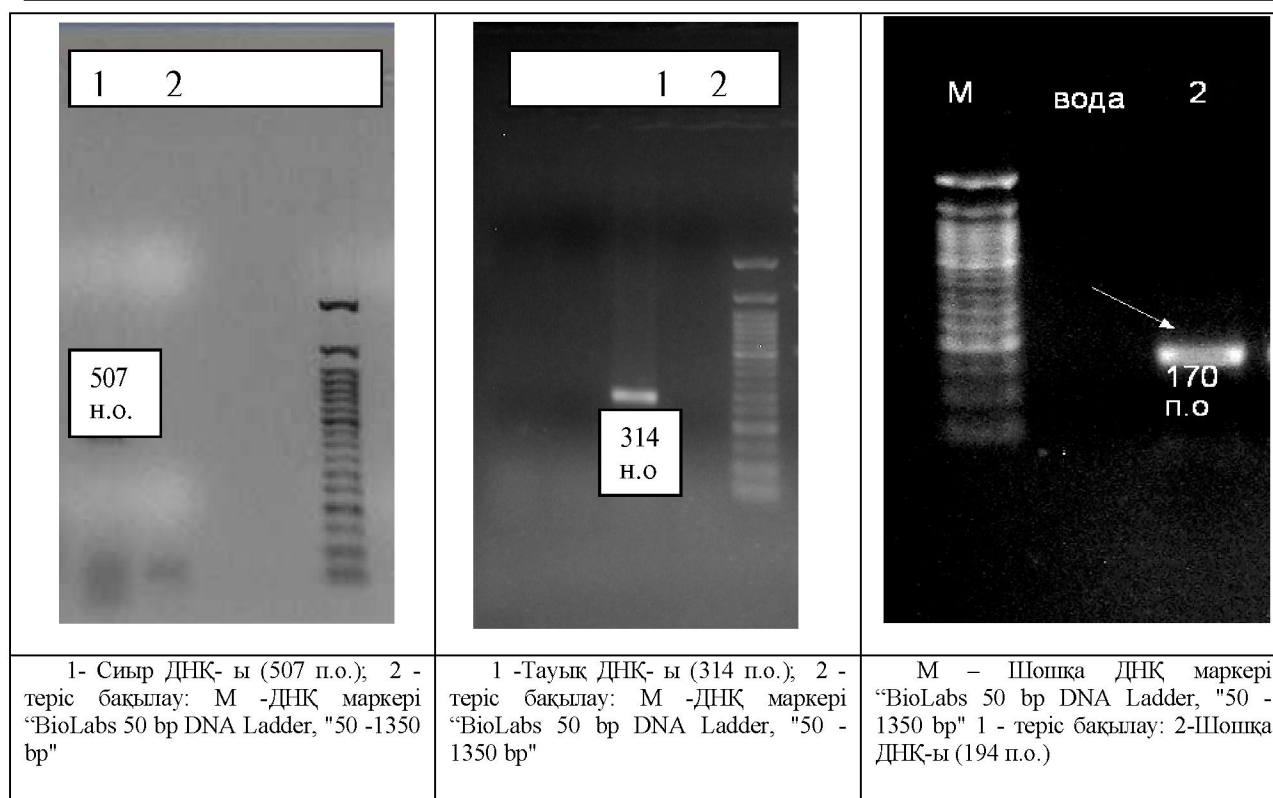
Температуралық және уақыттық профилі бойынша амплификация үдерісін тиімдестіру нәтижесі бойынша өнімдердің неғұрлым тиімді жиналуына температуралық және уақыттық бағдарламалар жасалды (2-кесте).

2-кесте. Амплификация режимінің бағдарламасы

Амплификация режимі	«BOS»	«SUS»	«GUL»
	94 ⁰ С – 3 минут – бір рет		
	94 ⁰ С – 30с } 35 63 ⁰ С-30с } цикл 72 ⁰ С – 30с }	94 ⁰ С – 30с } 35 65 ⁰ С - 30с } цикл 72 ⁰ С – 30с }	94 ⁰ С – 30с } 35 63 ⁰ -30с } цикл 72 ⁰ С – 30с }
	72 ⁰ С – 3 минут – бір рет		

Ары қарай амплификацияланған өнімдерді электрофорездеуді ДНК фрагменттерінің ұзындығын айқындайтын маркер бойынша жүргіздік.

Ет шикізатынан амплификацияланған ПТР өнімдер 1-суретте келтірілген.



1-сурет. Сиыр, тауық, шошқа ДНҚ праймерлерін қолдану арқылы алынған амплификация өнімінің электрофореграммасы

Сиырдың ДНҚ-на тән праймерлер SIM-BOS көмегімен сиырдың ДНҚ идентификацияланды, ПТР негізінде 507 пар нуклеотид түзілді.

Тауықтың ДНҚ-на тән праймерлер SIM-SUS көмегімен тауықтың ДНҚ идентификацияланды, ПТР негізінде 314 пар нуклеотид түзілді.

Ал шошқаның ДНҚ-на тән праймерлер SIM-GUL көмегімен шошқаның ДНҚ идентификацияланды, ПТР негізінде 194 пар нуклеотид түзілді.

ПТР-дің диагностикалық құндылығы

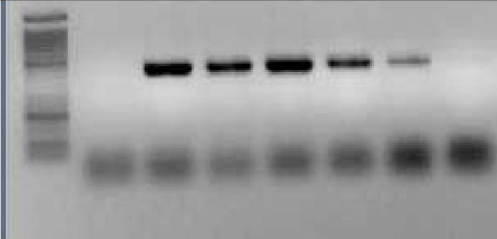
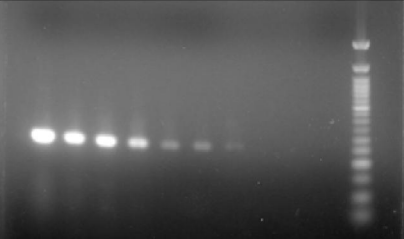
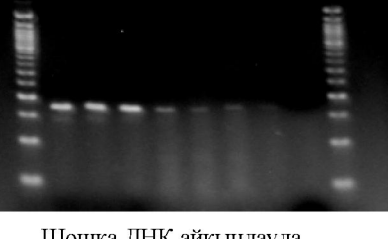
ПТР-дің диагностикалық құндылығы тәнділігін (спецификалығы) және сезімталдылығын айқындау арқылы анықталады.

Сиыр, тауық, шошқа ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының тәнділігі 2- суретте келтірілген.

<p>Сыыр ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының тәнділігі 1 – тауық ДНҚ-ы; 2- шошқа ДНҚ-ы; 3 –деиондалған су; 4 – сыыр ДНҚ-ы (507 п.о.); М – ДНҚ маркері “BioLabs 50 bp DNA Ladder, "50 – 1350 bp" 2 –сурет. Сыырдың ДНҚ-на тән праймерлер SIM-BOV қолдану арқылы алынған амплификация өнімінің электрофореграммасы</p>	<p>Тауық ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының тәнділігі 1 – деиондалған су; 2-тауық ДНҚ-ы(314 п.о.); 3 – сыыр ДНҚ; 4 –шошқа ДНҚ-ы; - М – ДНҚ маркері “BioLabs 50 bp DNA Ladder, "50 – 1350 bp" 3 –сурет. Тауық ДНҚ праймерін қолдану арқылы алынған амплификация өнімінің электрофореграммасы</p>	<p>Шошқа ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының тәнділігі 1 – Шошқа ДНҚ-ы(194 п.о.); 2- сыыр 3 –тауық ДНҚ –; 4,5,6- деиондалған су; М – ДНҚ маркері “BioLabs 50 bp DNA Ladder, "50 – 1350 bp" М – ДНҚ маркері “BioLabs 1.0 kb DNA Ladder, "500 – 10000 bp" 4 –сурет. Шошқа ДНҚ праймерін қолдану арқылы алынған амплификация өнімінің электрофореграммасы</p>
<p>Зерттеуде оң бақылауға сыыр ет шикізаттарының ДНҚ-ы, ал теріс бақылау үшін деиондалған су, тауық, шошқа ет шикізаттарының ДНҚ-лары қолданылды.</p>	<p>Зерттеуде оң бақылауға тауық ет шикізаттарының ДНҚ-ы, ал теріс бақылау үшін деиондалған су, сыыр, шошқа ет шикізаттарының ДНҚ-лары қолданылды.</p>	<p>Зерттеуде оң бақылауға шошқа ет шикізатының ДНҚ, ал теріс бақылау үшін деиондалған су, тауық, сыыр ет шикізаттарының ДНҚ-лары қолданылды.</p>

Өртүрлі ет шикізаттарының ДНҚ-ларын анықтауда сыыр ет шикізатының ДНҚ-ы SIM-BOS праймерлерімен 507 пар нуклеотидті, тауық ет шикізатының ДНҚ-ы SIM- SUS праймерлерімен 314 пар нуклеотидті, шошқа ет шикізатының ДНҚ-ы SIM-GUL праймерлерімен 194 пар нуклеотидті ПТР өнімдері түзілді.

Сыыр ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының сезімталдылығы. Сыыр, тауық, шошқа ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының сезімталдылығы ет шикізатының ДНҚ-ның 10 есе сұйылтылған, яғни 100 нг 1 фг дейінгі концентрацияларымен реакция жүргізу арқылы анықталады (3- сурет).

М	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	М	М	1	2	3	4	5	6	7	8	9	М
																												
Сыыр ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының сезімталдылығы.							10 пг; 6 – 1 пг; 7 – 0,1 пг; 8 – 10 фг; 9 – 1 фг. М– ДНҚ маркері “BioLabs 50 bp DNA Ladder, “50 – 1350 bp”.									Шошқа ДНҚ айқындауда ПТР реакциясының сезімталдылығы												
ДНҚ концентрациялары: 1 – 100 нг; 2 – 10 нг; 3 – 1 нг; 4 – 0,1 нг; 5 – 10 пг; 6 – 1 пг. М– ДНҚ маркері “BioLabs 50 bp DNA Ladder, “50 – 1350 bp”.							Тауық ДНҚ айқындауда ПТР әдісінің сезімталдылығы ДНҚ-ның 10 есе сұйылтылған, яғни 100 нг 1 фг дейінгі концентрацияларымен реакция жүргізу барысында 0,1 пг болып тұр.									ДНҚ концентрациялары: 1 – 100 нг; 2 – 10 нг; 3 – 1 нг; 4 – 0,1 нг; 5 – 10 пг; 6 – 1 пг; 7 – 0,1 пг; 8 – 10 фг; 9 – 1 фг. М– ДНҚ маркері “BioLabs 50 bp DNA Ladder, “500 – 10000 bp”												
Сыыр ДНҚ айқындауда ПТР әдісінің сезімталдылығы ДНҚ-ның 10 есе сұйылтылған, яғни 100 нг 1 фг дейінгі концентрацияларымен реакция жүргізу барысында 10 пг болып тұр.																Шошқа ДНҚ айқындауда ПТР әдісінің сезімталдылығы ДНҚ-ның 10 есе сұйылтылған, яғни 100 нг 1 фг дейінгі концентрацияларымен реакция жүргізу барысында 1 пг болып тұр.												

Қорытынды

Сыыр, тауық, шошқа ет шикізаттарын идентификациялауда тек қана аталған өнімдерге тән полимеразды тізбекті реакция жасалынды. Сезімталдылығы жағынан сыыр ДНҚ 10 пг концентрацияда, тауық ДНҚ 0,1 пг концентрацияда, ал шошқа ДНҚ 1 пг концентрацияда анықталды.

Сыыр, тауық, шошқа ет шикізаттарын идентификациялауда жасалынған полимеразды тізбекті реакция әдістері тәнділігімен және жоғарғы сезімталдылығымен ерекшеленеді.

ӘДЕБИЕТ

1. Комаров А.А., Обухов И.Л., Сорокина М.Ю., Панин А.Н., Шипулин Г.А. Определение видовой принадлежности тканей жвачных животных // Ветеринария, №3 – М., 2000. – С.59-62.
2. Lu J.C. Chang G. Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPP PCR) fingerprints in forensic species identification // Forensic science. -1994, vi 67, p. 103.
3. Nakajima H. Et al. Degradation of a PCR product by a heatstable deoxypibonuclease (Dnase) produced from Yersinia enterocolitica // Microbiol. Immunol.-1994, №38, p.153
4. Bebens M. Er al. Nachweis von Tierarten in erhitzten und komplexen Fleischerzeugnissen durch tierartspezifische PCR-Reaktionen // Fleischwirtschaft. – 1999, Jg.79, №5 с.97
5. Tartaglia M. Et.al. Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds a molecular approach to test for the presence of bovine-derived materials // J. of food protection.-1998, v.61, p 513

Резюме

Ет шикізатын идентификациялауда полимеразды тізбекті реакция әдісі жасалынды. Сыыр, тауық, шошқа ет шикізаттарын идентификациялауда жасалынған полимеразды тізбекті реакция әдістері тәнділігімен және жоғарғы сезімталдылығымен ерекшеленеді.

А.Р. САНСЫЗБАЙ, Н.Б.САРСЕМБАЕВА, Қ.М. РОМАШОВ, К.Т.СУЛТАНКУЛОВА, Д.А.САРЫБАЕВА

СУЩНОСТЬ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЯСНОГО СЫРЬЯ

Резюме

Для идентификации мясного сырья применялся метод полимеразной цепной реакции. Сущность метода полимеразной цепной реакции для идентификации мясного сырья коровы, свиней, курицы отличается специфичностью и высокой чувствительностью.

A.R. SANSYZBAI, N.B.SARSEMBAEVA, ROMASHOV K.M., K.T.SULTANKULOVA, D.A.SARYBAEVA

THE ESSENCE OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR IDENTIFICATION OF MEAT RAW MATERIAL

Summary

The method was applied to identification of meat raw materials polymerase chain reaction. The essence of a method polymerase chain reaction for identification of meat raw materials of a cow, pigs, a hen differs specificity and high sensitivity.